筛选标记循环利用质粒在毕赤酵母中的应用

李承 林影 梁书利

华南理工大学生物科学与工程学院，广州 510006

巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）是近年来发展迅速的一种高效表达的宿主菌。毕赤酵母属甲醇营养型酵母，具有操作简便、易于高密度培养、生长迅速、对翻译后的蛋白进行加工、生产成本低等优点。毕赤酵母表达系统已有 20 多年的研究开发使用历史，有多种表达载体和改良的宿主菌可供选择，可进行胞内表达或分泌表达。利用基于同源重组的 DNA 转化系统将基因整合进基因组是目前最重要的基因编辑手段之一，已经被广泛应用于毕赤酵母中；但毕赤酵母面临着筛选标记不足的难题。

在 Cre/*loxP* 系统中，当两个 *loxP* 位点以顺时针相同的方向放在一段序列之间时，Cre 酶能识别并切除该序列，留下一个 *loxP* 位点。当使用突变的 *loxP* 序列（例如 *lox71* 和 *lox66*），当被 Cre 重组酶识别并进行作用后，会留下一个新的突变的 *lox72* 位点，并不会与下次引入的 *loxP* 位点进行作用，从而避免了残留的 *loxP* 位点与新引入的 *loxP* 位点被 Cre 重组酶识别的可能。

本文通过在毕赤酵母通用质粒 pPICZA 和 pGAPZA 的基础上，在博来霉素抗性基因表达盒后融合了诱导表达 Cre 的表达盒，并在这两个表达盒前后引入了 *lox71* 和 *lox66* 位点，分别构建了质粒 pZACH 和 pGACH；进而进行筛选标记循环利用。具体过程如下：1、质粒转化毕赤酵母，使用博来霉素进行抗性筛选得到阳性转化子；2、将阳性转化子接种于含有诱导剂甲醇的 YPM 培养基中，培养过夜；3、将培养过夜的含菌体的培养基划线于不含抗生素的 YPD 平板上，培养至酵母单菌落可见；4、将 3 中的酵母单菌落同时点种于不含抗生素的 YPD 平板和含博来霉素的 YPDZ 平板上，如能在 YPD 平板上生长而不能在 YPDZ 平板上生长，则说明该菌落的博来霉素抗性表达盒已丢失，再使用 PCR 鉴定进行验证。整个抗性素标记丢失需要约 4-5 天。

使用质粒 pZACH 分别在毕赤酵母中表达了来源于柠檬酸杆菌（*Citrobacter amalonaticus*）CGMCC 1696 的植酸酶和来源于抗辐射不动杆菌（*Acinetobacter radioresistens*） CMC-1 的脂肪酶，这些质粒的抗性素标记丢失效率均大于 70%，而且植酸酶和脂肪酶的产量与菌体生长都和使用基础质粒 pPICZA 进行表达的结果相似。该质粒对外源蛋白表达以及菌体生长并无不良影响。

使用筛选标记循环利用质粒 pZACH 和 pGACH，可以克服毕赤酵母中筛选标记不足的缺点，便于更好地在毕赤酵母中进行基因改造，从而为毕赤酵母的进一步工业应用提供基础。

作者简况
作者姓名：李承
出生年月：1989 年 07 月 01 日
学历：博士研究生
现工作单位：华南理工大学
联系方式：l.cheng02@mail.scut.edu.cn